

THESIS

MUNICH

1967

DIE WIRKUNG VON NEBENNIERENRINDENHORMONEN AUF DAS
MEMBRANRUHEPOTENTIAL VON EINZELNEN MUSKELZELLEN

(Messungen am isolierten Rattenzwerchfell)

Franz-Gustav Koch

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

Aus der 1. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegk

DIE WIRKUNG VON NEBENNIERENRINDENHORMONEN AUF DAS
MEMBRANRUHEPOTENTIAL VON EINZELNEN MUSKELZELLEN
(Messungen am isolierten Rattenzwerchfell)

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Franz-Gustav Koch

München

1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr.G.RIECKER
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.H.SCHWIEGK
Dekan:	Prof.Dr.M.KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 4.4.1967

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Fragestellung

II. Physikalisch - chemische Grundlagen

III. Methodik

A) Messanordnung zur Membranpotentialmessung
einzelner Muskelfasern

B) Operationstechnik

C) Punktionsverfahren in vitro

D) Punktionsverfahren in situ

IV. Versuchsergebnisse

V. Besprechung der Versuchsergebnisse

VI. Zusammenfassung



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung und Fragestellung:

Der Wasser- und Elektrolythaushalt ist in den Leistungen der Mineralocorticoide auf das Innigste verkettet. Für das Verständnis der Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes ist das Zusammenwirken der drei wichtigsten Funktionskreise Zellstoffwechsel, extrazelluläre Flüssigkeitsphase und Nierenfunktionen ein unentbehrlicher Gesichtspunkt. Für die Erkennung und Beurteilung der Störungen des Wasser - Elektrolytstoffwechsels ist es zweckmäßig, wenn man zwischen der Stoffmenge und Stoffverteilung unterscheidet. Unter der Stoffmenge versteht man den gesamten Bestand des Organismus an Wasser und Elektrolyten. Dieser Körperbestand wird durch die äußere Stoffbilanz (= Einfuhr : Ausfuhr) determiniert. Die Regulationsmechanismen des Organismus sind darauf ausgerichtet, den Körperbestand von Wasser und Elektrolyten konstant zu halten. Verstärkte Zufuhr eines Stoffes durch den Magendarmtrakt oder auf parenteralem Wege wird normalerweise mit einer vergrößerten Ausscheidung desselben Stoffes kompensiert und umgekehrt. In der Erhaltung des normalen Stoffbestandes spielt das Nebennieren - Nierensystem eine entscheidende Rolle. Dementsprechend führen Erkrankungen dieser Organe nicht selten zu abnormen Schwankungen des Stoffbestandes entweder im Sinne eines Überschusses oder eines Mangels.

Beispielsweise führt eine Überproduktion von Aldosteron im Verlauf einer Herzinsuffizienz, einer chronischen Lebererkrankung oder beim nephrotischen Syndrom zu einer Retention

von Natrium oder Chlorid und Wasser. Umgekehrt bewirkt ein Ausfall der Nebennierenrinde einen Verlust dieser Stoffe mit den Folgen einer allgemeinen Hypovolämie und den Zeichen eines Kochsalzmangels. Die Plasmateilchenkonzentration steigt dabei an.

Von der Nierenfunktion her betrachtet, besteht die Aldosteronwirkung in einer vermehrten Natriumretention und in einer gesteigerten Kaliumausscheidung. Natriumentzug, Aderlaß, aufrechte Körperhaltung und Kaliumzufuhr bewirken eine gesteigerte Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde, Natriumzufuhr, Kaliumentzug und Infusionen senken die Aldosteronproduktion. Es liegt daher nahe, die Aldosteronproduktion als einen wichtigen Faktor der Regulation des intravasalen und interstitiellen Flüssigkeitsvolumens anzusehen.

Für die Betrachtung der Stoffverteilung innerhalb des Organismus hat es sich als zweckmäßig erwiesen, denselben vereinfachend als biphasisches, also zweikammeriges Flüssigkeitssystem aufzufassen. Der extrazelluläre Flüssigkeitsraum (EZR) umfasst die gesamte Blutbahn und das interstitielle Flüssigkeitsvolumen, wobei zunächst unberücksichtigt bleiben soll, daß sich der interstitielle Raum wiederum in mehrere Unterabschnitte verschiedener anatomischer Struktur und physiko - chemischer Dynamik unterteilt. Die extrazelluläre Flüssigkeit ist das die Zellen umspülende Medium. Als Intrazellulärraum (IZR) bezeichnen wir den Flüssigkeitsinhalt der gesamten Zellmasse des Organismus.

Ein Charakteristikum für die Wechselbeziehungen zwischen Zellen und extrazellulärer Flüssigkeit ist die intra - extrazelluläre Ionenverteilung. Hierfür ist ein Konzentrationsgefälle u. a. für Kalium von innen nach außen und für Natrium von außen nach innen, welches unter ständigem Energieaufwand des Zellstoffwechsels aufrecht erhalten wird, typisch. Aus diesem Grunde spricht man von „Ionenpumpen“, worunter man den Zellstoffwechsel versteht, der den Konzentrationsausgleich der genannten Kationen an der Zellmembran verhindert. Diese Konzentrationsunterschiede zwischen Zellflüssigkeit und Extrazellularraum bilden die Grundlage für so lebenswichtige Funktionen wie der Erregung von Nervenzellen, der Sekretion von Drüsenzellen, der Resorption durch Schleimhäute, der Kontraktion muskulärer Elemente, für die Aktivierung von Fermenten, für zahlreiche Einzelfunktionen der Nierentubuluszellen und für die Konstanthaltung des Zellwassergehaltes.

Unter zahlreichen experimentellen und klinischen Bedingungen, z. B. beim Sauerstoffmangel, bei Azidose oder Alkalose, unter Steroideinflüssen, bei Substratmangel und unter Einwirkung von Stoffwechselgiften kann die Funktionstüchtigkeit dieser Ionenpumpen Veränderungen erleiden. Die Folge ist dann eine Verteilungsstörung zwischen Zelle und extrazellulärer Flüssigkeit bei häufig normalem Körperbestand des betreffenden Stoffes.

Es gibt verschiedene Hinweise dafür, daß Aldosteron nicht nur in der Tubuluszelle den

Austausch von Kalium- und Wasserstoffionen gegen Natriumionen stimuliert, sondern auch an der Colonschleimhaut und an den Speichel- und Schweißdrüsen in den aktiven Natriumtransport eingreift (Moll und Koczorek 1962). Andere Untersucher konnten nachweisen, daß Aldosteron den Natrium- und Kaliumtransport in der Leber und in der Skelettmuskulatur aktiviert und die intrazelluläre Natriumkonzentration dieser Gewebe erniedrigt (Dulce und Günther 1960, Losert, Senft und Senft 1964).

Physikalisch - chemisch betrachtet verdankt die intra - extrazelluläre Potentialdifferenz, die an fast allen Körperzellen gefunden wird, ihre Entstehung den erwähnten unterschiedlichen Elektrolytkonzentrationen auf beiden Seiten der Zellmembranen und den elektrostatischen Eigenschaften der Membranstruktur. Es sollte deswegen die Frage experimentell untersucht werden, ob die durch einen Mangel von Mineralcorticoiden (bei Adrenalektomie) bewirkten Elektrolytstörungen an den Skelettmuskelzellen auch Veränderungen der intra - extrazellulären Potentialdifferenz (Membranruhepotential) nach sich ziehen.

Als wichtigstes Resultat ergab sich in den vorliegenden experimentellen Untersuchungen eine Hyperpolarisation der Skelettmuskelzellmembranen nach Adrenalektomie unter kochsalzärmer Ernährung und eine Normalisierung des Wertes unter NaCl - Zufuhr.

I. Physikalisch - chemische Grundlagen:

Die Ionenverteilung an der Zellmembran kann in grober Näherung als Ausdruck eines Donnan - Gleichgewichts beschrieben werden, wie es sich einstellt, wenn 2 Elektrolytlösungen durch eine Grenzfläche voneinander getrennt sind, die für die meisten Ionen permeabel jedoch zumindest für ein Ion impermeabel ist. Ein System, in dem das Proteinanion R^{n-} das nicht permeierende Ion darstellt, während K^+ und Cl^- frei diffusibel sind, sei schematisch dargestellt:



Die vertikale Linie sei die nur für das Anion R^{n-} impermeable Grenzfläche, x, y, z, bezeichnen die Ionenkonzentrationen im Gleichgewicht bei Elektroneutralität auf jeder Seite. In diesem Zustand besteht eine ungleiche Verteilung der diffusiblen Ionen:

$$x = y (y + z)$$

oder

$$r = \frac{x}{y} = \frac{y + z}{x}$$

Es ist ersichtlich, daß x größer ist als y, y + z größer ist als x und daß r über 1 liegt.

Eine entsprechende Verteilung von Kalium und Chlor findet sich an der Zellmembran von Muskeln und Nerven, die in ruh-

endem Zustand für Kalium sehr gut, für Chlor etwas weniger gut permeabel, für intrazelluläre Proteinanionen jedoch impermeabel ist:

$$\frac{(K^+)_{\text{a}}}{(K^+)_{\text{i}}} = \frac{(Cl^-)_{\text{i}}}{(Cl^-)_{\text{a}}}$$

Dieser Verteilung entspricht ein Diffusionspotential, wie es sich aufbaut, wenn Lösungen desselben Elektrolyten aber verschiedener Konzentration aneinander grenzen und die Elektrolyte A und B außerdem verschiedene Ionenbeweglichkeit haben. Es tritt dann ein Diffusionspotential E auf, das sich aus der Gleichsetzung der Expansionsarbeit und der aufgebauten elektrischen Energie ergibt und der von Nernst gefundenen Beziehung gehorcht:

$$E = \frac{R T}{F} \ln \frac{c_1}{c_2}$$

worin R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur, F die Faradaykonstante und c_1 und c_2 die Konzentrationen eines Elektrolyten fließseits und jenseits der Membran sind. Für die Verhältnisse an der Zellmembran gilt demnach:

$$E = \frac{R T}{F} \ln \frac{(K^+)_{\text{i}}}{(K^+)_{\text{a}}} = \frac{R T}{F} \ln \frac{(Cl^-)_{\text{a}}}{(Cl^-)_{\text{i}}}$$

vorausgesetzt, daß der Aktivitätskoeffizient 1,0 und damit die chemische Konzentration der Ionenaktivität gleichgesetzt werden kann.

Der Konzentrationsgradient für Natrium zwischen intra- und

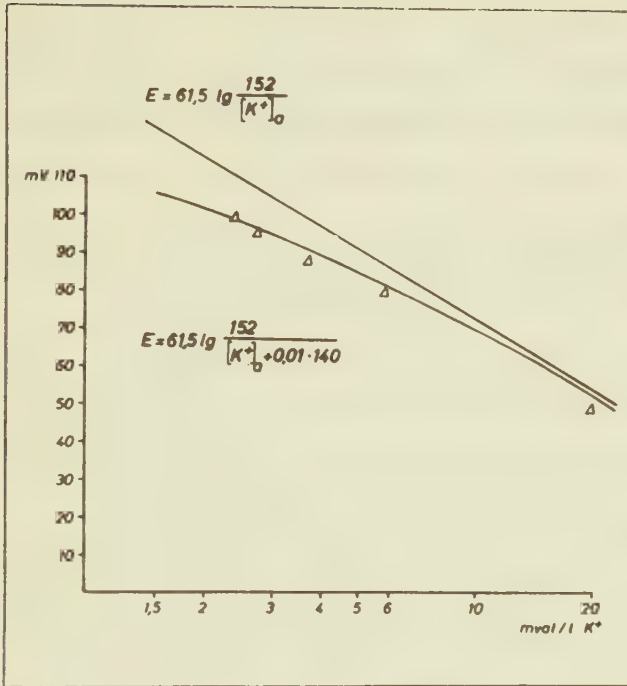


Abbildung I: Abhängigkeit des Membranpotentials von der äußeren Kaliumkonzentration (Röhrl 1964).

extrazellulärer Flüssigkeit wird durch einen aktiven Stoffwechselprozess aufrecht erhalten, der nach innen gelangte Natriumionen wieder nach außen befördert, so daß die ruhende Membran für Natrium effektiv impermeabel, seine Beweglichkeit in der Membran nahe Null ist. Dieser aktive Natriumaustritt kann an der Tintenfischnervenfaser durch Stoffwechselgifte (Dinitrophenol, Cyanid) reversibel gehemmt werden, ohne daß mit dieser Hemmung eine wesentliche Änderung des Natriumeinwärtsstromes einhergeht (Hodgkin und Keynes 1955). An der gleichen Nervenfaser wird auch der Kaliumeinstrom durch Stoffwechselgifte gehemmt, während der Kaliumauswärtsstrom unverändert bleibt. Dieser Befund führte zu der Annahme, daß die hohen Kaliumkonzentrationen im Faserninnern nicht allein Ausdruck einer passiven Verteilung an der ionenselektiv - permeablen Membran ist, sondern daß für ihr Zustandekommen ebenfalls Transportvorgänge verantwortlich sind, die Kalium aktiv in die Zelle befördern (Hodgkin und Keynes 1955).

Für Muskelfasern wird an der Vorstellung des „aktiven“ Natriumtransportes von innen nach außen festgehalten. Ob dazu ein stoffwechselabhängiger Kaliumtransport von außen nach innen erfolgt, ist vorläufig noch nicht entschieden.

Die nach der Nernstbeziehung aus den Kaliumkonzentrationen innen und außen zu errechnenden Potentialdifferenzen stimmen für hohe K_a sehr gut mit den gemessenen Werten überein. Für K_a unter 10 mV gilt diese Beziehung nicht mehr (Abb. 1).

Um die im Fließgleichgewicht an der Zellmembran ständig stattfindenden Ionenaustausche und relativen Permeabilitäten für die verschiedenen Ionenarten zu berücksichtigen, gelangten Hodgkin und Katz (1949) unter Verwendung der „constant field“ Theorie von Goldman (1944) zu folgender Gleichung, um das Membranpotential von Riesennervenfaseren zu errechnen:

$$E = \frac{R T}{F} \ln \frac{P_K (K^+)_{i} + P_{Na} (Na^+)_{i} + P_{Cl} (Cl^-)_{a}}{P_K (K^+)_{a} + P_{Na} (Na^+)_{a} + P_{Cl} (Cl^-)_{i}}$$

worin P_K , P_{Na} und P_{Cl} die relativen Permeabilitäten der drei wichtigsten Ionen sind.

Diese Gleichung beschreibt ein System, in dem Elektrolytlösungen verschiedener Konzentration der gleichen Ionen nicht direkt aneinander grenzen, sondern durch eine Membran getrennt sind. Nur in der Membran besitzen die Ionen A und B endliche, voneinander verschiedene Beweglichkeiten. Der Spannungsabfall über der Membran ist linear, so daß quer zur Membran ein konstantes elektrisches Feld herrscht.

Die Abweichung der gemessenen Ruhepotentialwerte bei niedrigen extrazellulären Kaliumkonzentrationen (10 mval/l) vom theoretischen Kaliumpotential, wie es sich aus der Nernstbeziehung ergibt, erklären Hodgkin und Horovitz (1959) durch eine hypothetische zusätzliche Permeabilität für Natriumionen:

$$E_{K-Na} = \frac{R \cdot T}{F} \ln \frac{(K^+)_{\text{i}} + \alpha (Na^+)_{\text{i}}}{(K^+)_{\text{a}} + \alpha (Na^+)_{\text{a}}}$$

Sie setzen $\alpha = 0,01$ und kamen dann den biologischen Potentialwerten erstaunlich nahe (Abb. 1).

III. METHODIK

A) MESSANORDNUNG ZUR MEMBRANPOTENTIALMESSUNG EINZELNER MUSKELFASERN

Für unsere Messungen verwandten wir Mikroglyselektroden nach Ling und Gerard (1949). Es handelt sich dabei um Glasröhrchen, deren Spitze mit einem Elektrodenziehgerät, das bei uns mit Federzug arbeitet, auf einen Durchmesser von $0,5\mu$ und darunter ausgezogen werden. Nachdem sie durch Heißluft (1 Std. 180°C) sterilisiert und unter sterilen Bedingungen über Methanol und Aqua dest. mit 3-molarer KCl Lösung gefüllt sind (Tasaki, Polley und Orego 1954), können sie als Elektroden verwandt werden. Die von uns verwandten Elektroden hatten einen elektrischen Widerstand von 3 - 30 M Ω . Der Stromkreis der Messanordnung geht aus Abb. 2 hervor. Die Potentialdifferenz wird durch das unpolarisierbare Elektrodenpaar Ling-Gerard Elektrode/chlorierter Silberdraht (AgCl, Ag) abgegriffen und mit einem Kathodenstrahloszillographen (Tektronix 502) gemessen. Beim Verfahren in situ verwenden wir als indifferente Elektrode eine chlorierte Silbernadel, beim Verfahren in vitro einen Kettenleiter, bei dem ein chlorierter Silberdraht wie bei der differentiellen Elektrode in 3-molare KCl Lösung taucht.

Im differentiellen Teil der Messanordnung sind Mikroelektrode, Kathodenfolger und Kathoden-

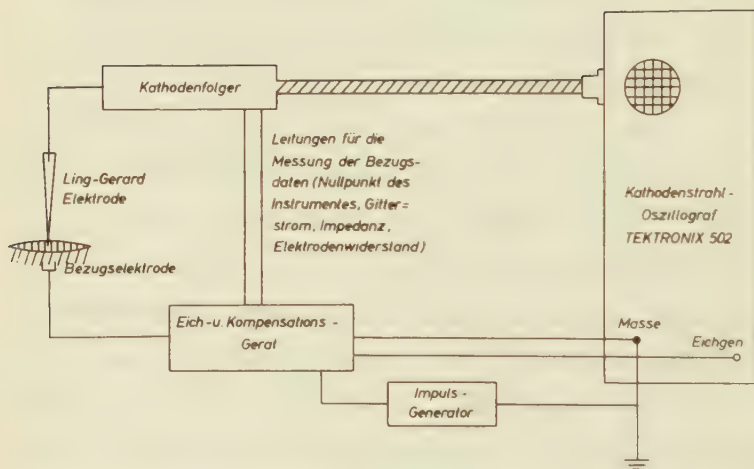


Abbildung 2

Stromkreis der Meßanordnung

strahloscillograph, der Erdbezug hat, angeordnet. Im indifferenten Teil befindet sich die AgCl, Ag Bezugselektrode, die über ein Eich- und Kompensationsgerät mit Erde verbunden ist. Der Kathodenfolgerverstärker hat einen Eingangswiderstand von mindestens $1000\text{ M}\Omega$, eine Eingangskapazität von 5 pF regelbar und einen Verstärkungsgrad von 1,02.

Die Lage des elektrischen Nullpunkts wird durch Kurzschließen des Kathodenfolgereingangs an Masse bestimmt. Die Größe des Gitterstroms, der bei Potentialmessungen an biologischen Substraten einen Wert von 10^{-10} Amp. nicht überschreiten darf (Burckhardt 1957), wird durch Kurzschließen des Kathodenfolgereingangs über einen Widerstand von 10^8 Ohm an Masse ermittelt. Ein zu hoher Gitterstrom wird mit einem Potentiometer im Kathodenstromkreis des Verstärkers auskompensiert.

Der Verstärkungsgrad wird durch einen geeichten Rechteckimpuls von 100 mV kontrolliert. Der Elektrodenwiderstand wird an Hand des Spannungsabfalls durch Parallelschaltung eines Widerstandes von $20\text{ M}\Omega$ zum Messstromkreis ermittelt.

Die Auskompensation eines Elektrodenpotentials („tip potential“) erfolgt mit Hilfe einer Potentiometerschaltung durch Batteriespannung.

B) OPERATIONSTECHNIK

Die Untersuchungen wurden an weißen Ratten mit einem Körpergewicht von $150 - 250\text{ gr}$ vorgenommen. Jeweils 4 - 6 Tieren

wurden am gleichen Tag die Nebennieren herausgenommen. Die Ratten bekamen zur Narkose 2 ccm Avertin in 2 % Lösung intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde das Fellhaar in Nähe des unteren Rippenbogens gestutzt und das Fell mit einem etwa 2 cm breiten Querschnitt durchgeschnitten. Dann wurde die Muskulatur seitlich der Rückenstrecker und dicht unterhalb des Rippenbogens eröffnet. Die Nebennieren waren dann oberhalb der Nieren als dunkle Körperchen im Fettgewebe sichtbar und wurden mit der Pinzette stumpf herausgelöst. Dabei traten keine nennenswerten Blutungen auf. Anschließend wurden die Wunden vernäht. Auf Sterilität wurde nicht geachtet.

Die Tiere bekamen Leitungswasser und Gerste, in der nach unseren flammenphotometrischen Analysen 0,0079 mval Na pro gr Gerste enthalten war. Auf Grund täglicher Gewichtskontrolle der Gerste, die den Ratten im Käfig zugänglich war, hat eine Ratte pro Tag maximal 4 gr Gerste gefressen. Die damit zugeführte Kochsalzmenge dürfte bei einer täglichen Ausscheidung im Harn von 4,5 Aeq/kg (Peters 1959) unbedeutend sein.

C) PUNKTIONSVERFAHREN IN VITRO

Nach etwa 7 - 9 Tagen wurden die Ratten adynamisch, was sich deutlich zeigte, wenn man die Ratten an einer Gitterwand klettern ließ. Dabei wurden die Ratten in drei verschiedene Stufen der Adynamie eingeteilt. Im ersten Stadium zeigten die Ratten an der Gitterwand eine geringere Kletter-

freudigkeit als normale Ratten. Im 2. Stadium machte die Ratte keine Kletterversuche mehr und ihr Haltevermögen war schwächer geworden. Im 3. Stadium zeigte die Ratte auch keine Lauflust mehr und blieb teilnahmslos sitzen, wenn man sie in eine neue Umgebung setzte. Die Ratte wurde dann zur Präparation des Zwerchfells narkotisiert (Avertin), und der Bauch- und Brustraum breit eröffnet. Mit einer Spritze wurde aus dem schlagenden Herzen rasch etwa 3 ccm Blut entnommen. Anschließend wurde ein annähernd dreieckiges Zwerchfellstück herausgeschnitten und möglichst rasch in vorbereitete Lösung gebreht. Dann wurde aus der Oberschenkelmuskulatur ein etwa 0,5 gr schweres Stück möglichst frei von Fascie, Fett und Blut zur Analyse herausgenommen.

Das abgezogene Blut wurde zentrifugiert und im Serum Na und bei ausreichender Menge auch K flammenphotometrisch bestimmt. Das extrahierte Stück Muskel wurde gewogen und anschließend getrocknet. Durch erneutes Wiegen wurde der Wassergehalt bestimmt. Dann wurde der Muskel pulverisiert und wieder eingewogen. Die Einwaage wurde in Petroläther geschüttelt, um das Fett zu extrahieren. Dann wurde der Petroläther abzentrifugiert, getrocknet und gewogen. Aus der Gewichts Differenz ergab sich der Fettgehalt des Muskels. Der Rest wurde in konz. HNO_3 gekocht und anschließend das K flammenphotometrisch bestimmt.

Eine seitliche Begrenzung des Zwerchfellpräparates bildet ein Teil des knöchernen Rippenringes. Die gegenüberliegende Spitze läuft aus in centrum tendineum. In einer von unten beleuchteten Flexiglas Kammer,

deren Boden mit einer Platte PVC Gummi ausgelegt ist, wird das Präparat über einen ca 0,5 cm hohen Steg unter leichter Dehnung mit Nadeln befestigt (Abb. 4). Die Kammer wird während des Versuchs ständig von Lösung durchspült, die aus einem Vorratsgefäß nachfließt, einen Thermostaten passiert und so aufgewärmt in die Kammer eintritt. Der Abfluß erfolgt durch ein Überlaufrohr. Die Temperatur der Kammerflüssigkeit wird auf einem Thermometer registriert und durch den Zufluß vorgewärmter Lösung zwischen $36,0^{\circ}$ und $37,0^{\circ}$ C konstant gehalten. Im Vorratsgefäß wird die Lösung durch eine Gaseinleitungskerze mit Carbogen aufgesättigt.

Andere Gruppen von adrenalectomierten Ratten bekamen Altromin - Rattenfutter und Kochsalzlösung ($\frac{2}{3}$ isoton. Kochsalzlösung : $\frac{1}{3}$ Wasser) zu trinken. Außerdem bekamen sie pro Tag 0,17 mg Aldocorten subcutan injiziert. Nach 4 Tagen wurde in gleicher Weise wie bei den übrigen Ratten Blut abgezogen und das Zwerchfell herauspräpariert, sowie ein Stück Muskulatur zur Analyse herausgenommen.

Zur Punktion einzelner Muskelzellen wird eine Mikroelektrode nach Ling und Gerard, die auf kürzestem Wege mit dem Eingang des Kathodenfolgers verbunden ist, am Arm eines Mikromanipulators gehalten und unter mikroskopischer Kontrolle an eine Stelle mit parallel ausgespannten Muskelfasern herangeführt.

Beim Einbringen der Glaselektrode in die Flüssigkeit stellt sich ein Elektrodenpotential ein, das je nach Sauberkeit

der Elektrode 5 - 25 mV beträgt. Es wird auskompensiert und danach entsprechend dem beschriebenen Vorgehen der Elektrodenwiderstand bestimmt.

Bei weiterem Tieferdrehen der Elektrode über der mikroskopisch ausgemachten Zwerchfellstelle kommt es plötzlich auf dem Schirm des Kathodenstrahloscillo-graphen zu einem Potential-sprung, der anzeigt, daß die erste Muskelzelle erreicht wurde und die Elektrodenspitze intrazellulär liegt. Bei weiterem Vordrehen können auf diese Weise während einer Penetration des Zwerchfells bis zu 15 Zellen punktiert und ihre Ruhe-potentiale gemessen werden. Es werden nur sprunghaft sich einstellende Potentiale registriert.

Es wurde eine Stillslösung folgender Zusammensetzung verwandt.

Lösung (Krebslösung für Warmblüter nach Krebs und

Henseleit 1932)

NaCl	0,690 gr/100 ccm
KCl	0,035 gr/100 ccm
CaCl ₂	0,028 gr/100 ccm
MgSO ₄	0,014 gr/100 ccm
NaHCO ₃	0,209 gr/100 ccm
KH ₂ PO ₄	0,016 gr/100 ccm
Glucose	0,120 gr/100 ccm

D) PUNKTIONSVERFAHREN IN SITU

Bei den Punktionen in situ wurde nach der Narkose mit 2 ccm Avertin in 2 % Lösung intraperitoneal das Fell der Ratte etwa 2 - 3 cm oberhalb des Schwanzansatzes mit einem Längsschnitt von 3 cm eröffnet und mit einer Spreizklemme auseinandergezogen. Die Fascie der Oberschenkelmuskulatur wurde etwa 1 - 2 cm durchtrennt und glitt leicht auseinander. In die, von dem hochgezogenen Fell umrahmte, Öffnung wurde auf 37° C erwärmte Krebslösung gefüllt, bis die Muskulatur mit einer dünnen Schicht bedeckt war. Die indifferente Elektrode wurde in das Bindegewebe eingestochen. Anschließend wurde in gleicher Weise wie bei den in vitro Versuchen punktiert.

Bei jeder Ratte wurden etwa 80 Einzelwerte gemessen. Von diesen Einzelwerten wurden die 20 höchsten, die bei jedem Kollektiv etwa auf dem gleichen Niveau lagen, genommen und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

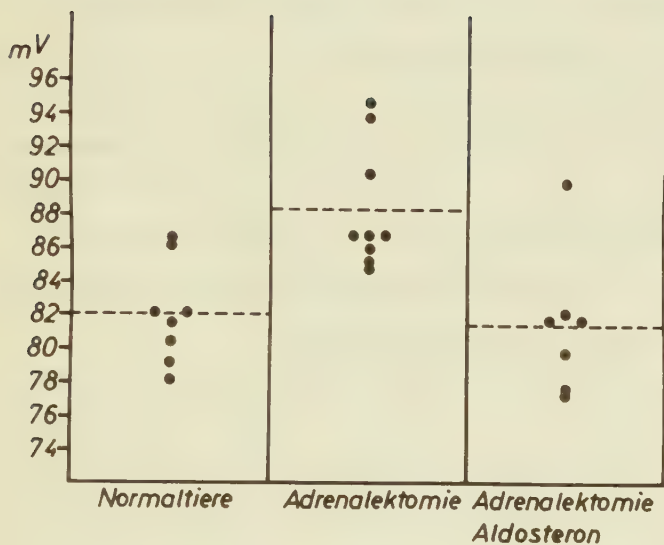


Abb. III: Der Mittelwert der drei Kollektive

1. Normaltiere

2. Nach Adrenalektomie

3. Nach Adrenalektomie + Substitution mit
Aldosteron.

IV. VERSUCHSERGEBNISSE

Tabelle I : Das mittlere Membranruhepotential bei acht normalen Ratten betrug $82,1 \pm 2,9$ mV bei einem Serumnatriumwert von durchschnittlich $121,2$ mval pro Liter und einem Muskelkaliumgehalt von $115,2$ mval pro kg Feuchtgewicht.

Tabelle II : Das Membranruhepotential von adrenaletomierten Ratten unter kochsalzarmer Kost war nach 7 bis 9 Tagen nach der Operation auf $88,38 \pm 3,7$ mV erhöht. Bei allen neun untersuchten Tieren waren die Zeichen einer Adynamie objektivierbar. Der Serumnatriumspiegel war im gleichen Kollektiv $109,5$ mval pro Liter und die Muskelkaliumkonzentration auf $112,7$ mval pro kg Feuchtgewicht erniedrigt.

Tabelle III : Drei weitere Tiere wurden adrenaletomiert aber mit kochsalzreicher Kost ernährt. Dabei ergab sich ein durchschnittliches Membranruhepotential von $78,2 \pm 1,7$ mV und eine Serumnatriumkonzentration von $116,2$ mval pro Liter. Beide Werte fallen in den Normbereich (s. Tabelle I).

Tabelle IV : Bei einem weiteren Kollektiv von 7 adrenaletomierten Ratten wurde eine NaCl-reiche Kostform und Aldosteron 4 Tage lang in einer Dosierung von $0,15$ bis $1,0$ mgr pro Tag verabreicht. Auch in dieser Versuchsgruppe ergaben sich mit durchschnittlich $81,5 \pm 4,3$ mV normale Membranruhepotentiale bei einem Serumnatriumwert von $129,5$ mval pro Liter und einem Serumkaliumwert von $5,35$ mval pro Liter.

Tabelle V bis VII : Abweichend von den geschilderten Erfahrungen am isolierten Rattenzwerchfell ergab sich bei Messung in situ ein erniedrigtes Membranruhepotential nach Adrenalectomie. Allerdings sind die Kontrollkollektive zu klein, um zu den sechs Versuchstieren des pathologischen Kollektivs eine Signifikanzberechnung durchzuführen.

V. BESPRECHUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE

Die in Tabelle I gefundenen mittleren Werte des Membranpotentials der isolierten Skelettmuskelzellen der Katze stimmen mit den in der Literatur mitgeteilten Messwerten an Skelettmuskelfasern gut überein. So fanden Ling und Gerard (1949) bei Einzelfaserpunktionen am musculus sartorius des Frosches in vitro ein mittleres Ruhepotential von $84,5 \pm 3,2$ mV. Am gleichen Substrat ergaben Messungen von Nastuk und Hodgkin (1949) in vitro ein mittleres Ruhepotential von $88,0 \pm 1$ mV. und ein mittleres Aktionspotential von $119,0 \pm 1$ mV. In derselben Größenordnung liegen die Messwerte von Warmblüterzellen. Trautwein, Link und Kayser (1953) ermittelten am Skelettmuskel des Meerschweinchens ein Ruhepotential von $84,5 \pm 0,42$ mV und am Skelettmuskel der Katze ein solches von $79,5 \pm 0,42$ mV. Weiteres tierexperimentelles Zahlenmaterial siehe bei Weidmann (1956). Creutzfeld (1962) untersuchte eine Normalperson auf operativem Wege und fand ein mittleres Membranpotential von $87,4 \pm 8,9$ mV. Bolte, Niecker und Ahl (1963) ermittelten an 19 gesunden Personen am Unterarm ein mittleres Ruhepotential der Skelettmuskelzelle von $87,2 \pm 5,2$ mV.

Im Kapitel II wurde bereits ausgeführt, daß das Ruhepotential von Muskelzellen eine weitgehende Abhängigkeit von der intra- - extrazellulären Kaliumdifferenz aufweist und dabei der

quantitativen Beziehung, wie sie die Nernstsche Gleichung ausdrückt, folgt. Danach führt eine Erhöhung des Kaliumkonzentrationsquotienten zu einer Erhöhung des Membranpotentials, was als Hyperpolarisation der Zellmembran bezeichnet wird. Dieser Befund wird gewöhnlich bei allgemeinem Kaliummangel mit Verminderung der extrazellulären Kaliumkonzentration (Hypokaliämie) gefunden. (Riecker, Bolte und Röhl 1964). In diesem Zustand nimmt der spezifische Membranwiderstand zu der Permeabilität für Natrium- und Kaliumionen ab (Jenerick 1953 am Frischmuskel).

Im vorliegenden Fall läßt sich die durch Adrenalektomie hervorgerufene Hyperpolarisation der Muskelzellmembran nicht durch eine Erhöhung des Kaliumkonzentrationsquotienten erklären. Wie aus Tabelle II hervorgeht, fand sich das Muskelkalium nach Adrenalektomie erniedrigt, was Befunden von Losert, Senft und Senft (1964) entspricht und auf einen erniedrigten Quotienten $K_{innen}/K_{außen}$ schließen läßt. Eher würde man aus diesen muskelchemischen Resultaten eine Erniedrigung des Membranruhepotentials erwarten.

Eine Erniedrigung des Membranpotentials nach Adrenalektomie fand sich aber bei jenen Tieren, bei denen Membranpotentiale am 5. bis 8. Tag nach der Operation in situ gemessen wurden (Tabelle VI). Dies stimmt mit Messergebnissen von Galand, Ildevonsd, Rougier und Gargouil (1965) gut überein. Hier wie dort fand sich außerdem eine Normalisierung des Membranpotentials unter Zufuhr von Mineralocorticoiden.

Wenn man einmal davon ausgeht, daß die elektrophysiologischen Untersuchungen der Skelettmuskulatur in situ dem klinischen Zustand am nächsten kommt, dann muß man aus den vorliegenden Resultaten schließen, daß das Fehlen von Minerslocorticoiden zu einer ionalen Verteilungsstörung an der Skelettmuskelzellmembran führt, die sich nicht nur in chemischen Konzentrationsveränderungen von Kalium sondern auch in einer verminderten Leitfähigkeit der Zellmembran für Ionen bemerkbar macht. Es liegt nahe, daß die beim Morbus Addison zu beobachtenden muskulären Funktionsstörungen (z. B. Muskelschwäche) durch diese Abnormitäten der Zellgrenzflächenfunktion mit verursacht werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Am isolierten Zwerchfell oder an der Oberschenkelmuskulatur in situ adrenaletomierter Ratten wurde das Membranruhepotential mit Hilfe von Mikroelektroden gemessen.
2. Bei den Messungen in vitro führte die Adrenaletomie zu einer Erhöhung des Membranruhepotentials und bei den Messungen in situ zu einer Membrandepolarisation. Nach Adrenaletomie wurde eine erniedrigte Serumnatriumkonzentration und eine erniedrigte Muskelkaliumkonzentration pro kg Feuchtgewicht ermittelt. Die Zufuhr von NaCl oder Aldosteron nach Adrenaletomie hatte eine Normalisierung der beobachteten Abweichungen zur Folge.
3. Die in situ gemessene Membrandepolarisation stimmt mit Messungen anderer Autoren überein und berechtigt zu der Annahme, daß die durch den Mineralcorticoidausfall bedingten funktionalen Verteilungsstörungen an der Zellmembran von Skelettmuskelzellen wenigstens zum Teil die klinisch zu beobachtenden neuromuskulären Funktionsstörungen erklären.

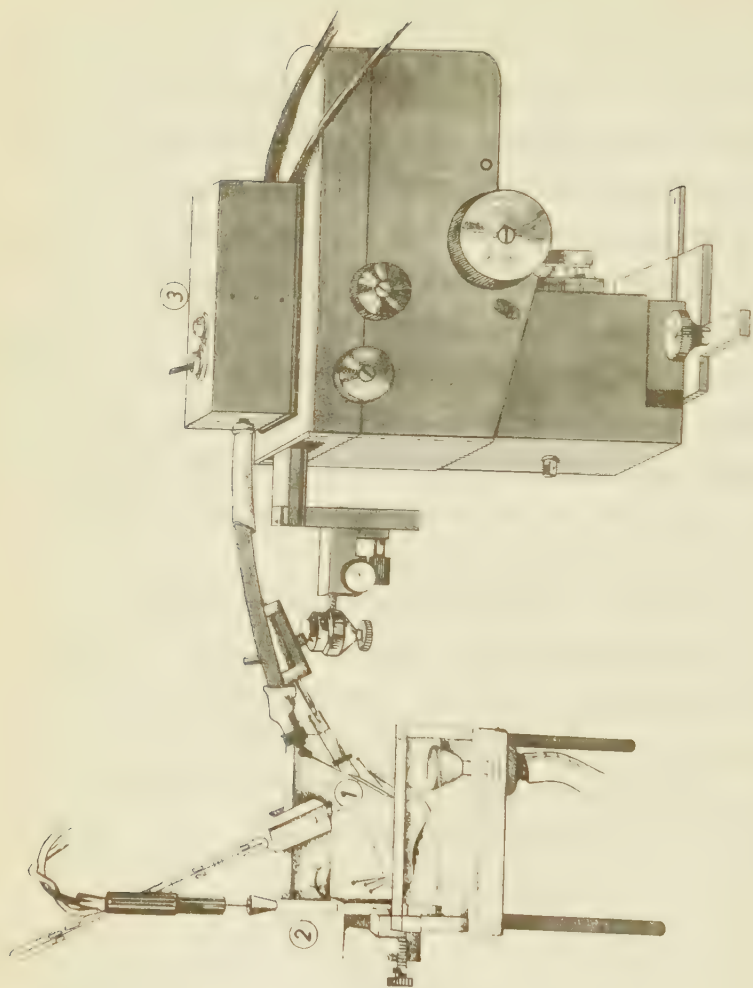


Abbildung 4: Versuchsanordnung zur Punktion einzelner Muskelfasern
am isolierten Rattenzwerchfell in vitro
1 Mikroelektrode nach LING und GERARD
2 indifferente Elektrode
z Kathodenfolterverstärker

	Datum	Gewicht gr	Serum-Na mval/l.	Muskel - K			Mittel- wert mV	s.d.
				mval kg.Tr.S.	mval kg.F.G.	mval l. H ₂ O		
1.	20. 1.	131,4	119,5	515,9	120,7	166,5	79,2	1,2
2.	"	108,1	122,5	528,1	117,6	153,1	82,2	2,5
3.	"	139,5	121,0	506,6	114,3	148,4	80,4	1,0
4.	"	137,1	131,0	483,8	112,5	147,4	81,6	2,0
5.	22. 1.	---	---	488,5	112,9	147,6	86,7	4,1
6.	"	---	115,5	459,1	109,6	145,4	86,2	3,9
7.	"	---	116,5	490,8	115,4	151,8	82,3	3,8
8.	24. 1.	---	124,5	502,3	118,8	156,1	78,2	1,9
Mittelwerte :			121,2	496,9	115,2	152,0	82,1	
mittlere Streuung :							2,9	

I. Tabelle : Normal - Kollektiv nicht operierter Ratten.

Isoliertes Rattenzwerchfell in vitro.

Datum	Gewicht gr	Serum-Na mval/l.	Muskel - K			Ady- namie	Mittel- wert mV	s.d.
			mval kg.T.S.	mval kg.F.G.	mval l.H ₂ O			
15. 1.	---	112,0	514,6	117,5	152,9	+	86,8	6,4
18. 1.	---	---	481,5	111,4	146,2	++	86,7	3,2
"	---	111,3	500,8	114,0	149,2	++	93,8	4,0
24. 1.	---	113,5	563,6	129,6	168,8	+	86,0	3,3
27. 1.	150	94,0	524,0	83,9	108,8	+++	85,2	4,6
"	150	112,5	473,3	111,7	146,8	++	84,8	2,9
30. 1.	150	110,0	531,7	119,1	154,5	++	90,5	4,3
31. 1.	150	105,5	517,9	113,8	145,9	+	94,7	5,0
"	150	117,5	495,9	113,7	148,2	++	86,7	3,8
Mittelwert :		109,5	511,5	112,7	146,9		88,38	3,7

II. Tabelle : Membranpotentiale bei adrenaletomierten Ratten bei
NaCl - armer Kost 7 - 9 Tage nach der Operation.
Isoliertes Rattenzwerchfell in vitro.

	Datum	Serum-Na mval/l.	Serum-K mval/l.	Mittelwert mV	s.d.
1.	3. 2.	122,5	4,85	76,8	2,1
2.	"	116,5	5,45	79,0	4,0
3.	4. 2.	109,5	5,7	78,8	1,6
Mittelwerte :		116,2	5,3	78,2	1,7

III. Tabelle : Membranpotentiale adrenaletomierter Ratten bei
NaCl - reicher Kost.
Isoliertes Rattenzwerchfell in vitro.

Datum	Serum-Na	Serum-K	Muskel - K			Mittel- wert mV	s.d.
			mval mval/l.	mval kg.F.G.	mval l. H ₂ O		
1. 20. 12.	134,0	3,95	506,2	109,5	142,1	82,2	2,1
2. "	132,0	4,9	505,7	100,6	130,5	90,0	8,5
3. "	130,8	6,0	510,7	119,1	155,6	77,6	1,8
4. 9. 1.	126,0	7,2	510,8	116,4	151,1	81,8	2,9
5. "	124,0	6,6	512,7	116,7	151,8	79,8	1,1
6. 3. 2.	130,0	4,1	470,8	108,7	141,9	81,6	2,6
7. "	130,0	4,75	450,7	106,4	139,6	77,3	2,7
Mittelwerte :	129,5	5,35	495,4	111,1	144,6	81,5	4,3

IV. Tabelle : Membranpotentiale adrenaletomierter Ratten bei NaCl -
reicher Kost nach 4 tägiger Injektion von 0,15 mg Aldo-
corten pro Ratte (1. - 5. Ratte) pro Tag bzw. von
1,0 mg Aldocorten pro Ratte (6. - 7. Ratte) pro Tag.
Isoliertes Rattenzwerchfell in vitro.

	Datum	Mittelwert	s.d.
		mV	
1.	5. 2.	92,3	5,96
2.	"	90,9	3,5
3.	7. 2.	93,5	3,5

Mittelwert des Kollektivs : 92,2 mV

s.d. : 2,5

V. Tabelle : Membranpotentiale unbehandelter Ratten
in situ.

	Datum	Adynamie	Mittelwert	s.d.
			mV	
1.	11. 2.	+++	83,9	4,2
2.	"	+++	71,3	5,7
3.	17. 2.	+	75,2	9,3
4.	18. 2.	++	79,25	8,1
5.	19. 2.	++	80,6	3,3
6.	19. 2.	++	82,5	3,3

Mittelwert des Kollektivs : 78,8

s.d. : 4,7

VI. Tabelle : Membranpotentiale adrenaletomierter
Ratten am 5. - 8. Tag nach der Operation
in situ punktiert.

	Datum	Mittelwert	s.d.
		mV	
1.	7. 2.	93,5	3,5
2.	"	85,7	2,5
3.	19. 2.	90,6	3,1

Mittelwert des Kollektivs : 89,93

s.d. : 4,0

VII. Tabelle : Membranpotentiale nicht operierter Ratten
nach 4 tägiger Injektion von 1 mg Aldocorten
pro Ratte pro Tag in situ.

Literaturverzeichnis

- Addison T.: On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules.
London: Highley (1855)
- Allers W. D., Kendall E. C.: Maintenance of adrenalectomized dogs without cortin through control of the mineral constituents of the diet.
Am. J. Physiol. 118 87 (1937)
- Baumann E. J., Kurland S.: Changes in the inorganic constituents of blood in suprarenalectomized cats and rabbits.
J. biol. Chem. 71 281 (1927)
- Bolte H. D., Riecker G., Röhl D.: Messungen des Membranpotentials an einzelnen quergestreiften Muskelzellen des Menschen in situ.
Klin. Wschr. 41 356 (1963)
- Brown - Sequard C. E.: Experimental research on the physiology and pathology of the adrenal capsules.
Compt. rend. Soc. Biol. 43 422 (1856)
- Burckhardt D.: Die Uebertragereigenschaften elektrophysiologischer Versuchsanordnung.
Z. Biol. 109 297 (1957)
- Convay E. J., Hingerty D.: The influence of adrenalectomy on muscle constituents.
Biol. J. 40 (1946)

Crabbé J.: Stimulation of active sodium transport by the
isolated toad bladder with aldosterone in vitro.
Clin. Invest. 40 (1961)

Creutzfeld D.: Membranpotentiale in menschlichen Muskeln
bei gesunden Personen und Patienten mit Adynamia
episodica hereditaria und periodischer Lähmung.
Naturwissenschaften 12 284 (1962)

De Fremery F., Laqueur E., Reichstein T., Spannhoff T. W.,
Uyldert I. E.: Corticosteron, crystallized
compound with biological activity of adrenal
cortical hormone.
Nature (London) 135 26 (1937)

Dulce H. J.: Der Einfluß von Aldosteron und Hypophysen-
hinterlappenhormonen auf den zellulären Elektrolyt-
und Wassergehalt.
Elektrolyt - Colloquium (Kassel: 1960)

Dulce H. J., Günther Th., Schütte E.: Studien über den
Wasser- und Salzhaushalt.
Clinica Chimica Acta 3 (1958)

Dulce H. J., Günther Th.: Steuerung des zellulären Elektro-
lyt- und Wassergehaltes durch Hormone.
Naunyn - Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u.
Pharmak. 238 368 (1960)

- Flanagan J. S., Davis A. K., Overman R. R.: Mechanism of extracellular sodium and chloride depletion in the adrenalectomized dog.
Am. J. Physiolog. 160 89 (1950)
- Galand G., Ildefonse M., Rougier O., Bargouil Y. M.: Données microélectrophysiologiques cellulaires concernant l'insuffisance surrénalienne expérimentale: Etiopathologie du syndrome addisonnien
Reanim Organes Artif 22 41 - 57 (1965)
- Gaudino M., Levitt M. F.: Influence of adrenal cortex on body water distribution and renal function.
J. clin. Invest. 28 1487 (1949)
- Gaunt R., Birnie J. H., Eversole E. J.: Adrenal cortex and water metabolism.
Physiolog. Rev. 29 281 (1949)
- Giroud C. J. P., Stachenko J., Venning E. H.: Secretion of aldosterone by the zona glomerulosa of rat adrenal glands incubated in vitro.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 92 154 (1956)

Goldmann D. E.: Potential impedance and rectification in membranes.

J. ges. Physiolog. 27 37 (1944)

Grollmann A.: Water and electrolyte contents of tissues of the adrenalectomized and adrenalectomized - nephrectomized dog.

Am. J. Physiolog. 179 36 (1954)

Gross F.: Die Steuerung der Aldosteronsekretion.

Schweiz. med. Wschr. 89 1 (1959)

Gross F.: Extrarenale Wirkungen von Aldosteron.

Deutsche med. Wschr. 42 (1961)

Gross F.: Nebennierenrinde und Wasser - Salzstoffwechsel unter besonderer Berücksichtigung von Aldosteron.

Klin. Wschr. 35/36 (1956)

Harrop G. A., Soffer L. J., Ellsworth R., Trescher J. H.:

Studies on the suprarenal cortex

J. Exp. Med. 58 17 (1933)

Hodgkin A. L., Horovitz P.: The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres.

J. Physiolog. 148 127 (1959)

Hodgkin A. L., Katz B.: The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid.

J. Physiolog. 108 37 (1949)

Hodgkin A. L., Keynes R. D.: Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo.

J. Physiolog. (London) 128 28 (1955)

Hodgkin A. L., Nastuk W. L.: Membrane potentials in single fibres of the frogs sartorius muscle.

J. of Physiolog. 108 (1949)

Jenerick H. P.: Muscle membrane potential, resistance and external potassium chloride.

J. of Cell. and Comp. Phys. 42 (1953)

Koczorek Kh. R., von Bubnoff M., Riecker G.: Acidose und Aldosteron.

Klin. Wschr. 40 113 (1962)

Koczorek Kh. P.: Der Natriumstoffwechsel und die Bedeutung des Aldosteron für den Wasser- und Salzhaushalt des Körpers.

Regensburger Jahrbuch für Ärztliche Fort-
bildung 8 (59/60/61)

Krück F.: Extrarenale Elektrolytverschiebungen unter der Einwirkung von Aldosteron.

Klin. Wschr. 12 (1959)

Ling G., Gerard R. W.: The normal membrane potential of frog sartorius fibres.

J. cell. comp. Physiolog. 34 383 (1949)

Loeb R. F., Atchley D. W., Benedict E. M., Leland J.:

Electrolyte balance studies in adrenalectomized dogs with particular reference to the excretion of sodium.

Exp. Med. 57 775 (1933)

Losert W., Senft C., Senft G.: Extrarenale Wirkungen des Aldosterons und der Spirolectone.

Naunyn - Schmiedeberg's Archiv exp. Path. u. Pharmak. 248 450 (1964)

Marine D., Baumann E. J.: Duration of life after supra - renalectomy in cats and attempts to prolong it by infections of solutions containing sodium salts, glucose and glycerol.

Am. J. Physiolog. 81 86 (1927)

Moll H. Ch., Koczorek Kh. R.: Über den Einfluß eines Aldosteronantagonisten (SC - 8109) auf die Resorption von Natrium aus dem Magen - Darmtrakt von Ratten.

Klin. Wschr. 16 (1962)

Peters G.: Die Verteilung von Wasser und Elektrolyten im Organismus normaler und adrenalectomierter, un - behandelter oder mit NNR - hormonen behandelter Ratten und ihre Beeinflussung durch große orale Wassergaben.

Naunyn - Schmiedeberg's Archiv exp. Path. u. Pharmak. 237 119 (1959)

Peters G.: Der Einfluß von NNR - hormonen auf die renale Wasser - und Elektrolytausscheidung bei adrenal - ektomierten und normalen Ratten nach Gabe von Wasser oder isotonischer NaCl - Lösung und im Durst.

Naunyn - Schmiedeberg's Archiv exp. Path. u. Pharmak. 235 155 (1959)

Riecker G., Bolte H. D., von Bubnoff M.: Ein Verfahren zur Messung von Einzelfaser - Potentialen menschlicher Muskelzellen in situ.

Pflügers Archiv ges. Physiolog. 277 231 (1963)

Rogoff J. M., Stewart G. N.: The influence of adrenal extracts on the survival period of adrenalectomized dog.

Science 66 327 (1927)

Selye H.: Physiology and Pathology of exposure to stress.

Acta Inc. (1950) Montreal

Simpson S. A., Tait J. F., Wettstein A., Neher R., von Euw J.,

Schindler O., Reichstein T.: Konstitution des Aldosteron,
des neuen Mineralcorticoid.

Experientia 10 132 (1954)

Stern T. N., Cole V. V., Bass A. C., Overman R. R.: Dynamic

aspects of sodium metabolism in experimental
insufficiency using radioactive sodium.

Am. J. Physiolog. 164 437 (1951)

Swingle W. W., Parkins W. M., Taylor A. R., Hays H. W.:

A study of water intoxication in the intact and
adrenalectomized dog and the influence of adrenal
cortical hormone upon fluid and electrolyte
distribution.

Am. J. Physiolog. 119 557 (1937)

Tasaki J., Polley E. H., Orego P.: Action potentials from

individuel elements in cat geniculate and striate
cortex.

J. Neurophysiolog. 17 454 (1954)

- Trautwein W., Zink K., Kayser K.: Ueber Membran- und Aktionspotentiale einzelner Fasern des Warmblüterskelettmuskels und ihre Veränderung bei der Ischämie.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 257 20 (1953)
- Weidmann S.: Elektrophysiologie der Herzmuskelfaser.
Bern: Huber (1956)
- Wheeler T. D., Vincent S.: The question as to the relative importance to life of cortex and medulla of the adrenal bodies.
Trans. Roy. Soc. Canada 11 125 (1927)
- Wilbrand W.: Die Bedeutung der Corticosteroide für Ionen-transporte.
Schweiz. med. Wschr. 14 363 (1959)

Lebenslauf

Am 4. 9. 39 bin ich als Sohn des Dipl. Ing. Franz Otto Koch und seiner Frau Elisabeth Koch, geb von Schmeling, in Dresden geboren worden. Gegen Ende des Krieges flohen meine Eltern mit ihren vier Kindern in den Westen. Dort besuchte ich die Volksschule und das Gymnasium in Düsseldorf, Essen und zuletzt in Baden-Baden, wo ich 1960 die Reifeprüfung bestand. Im Sommer 1960 begann ich in Kiel Medizin zu studieren. Später wechselte ich nach Freiburg und machte dort mein Vorphysikum und Physikum. Die klinischen Semester studierte ich in München. Hier bekam ich auch die Gelegenheit, meine Dr.-Arbeit zu schreiben. Im Juni 1966 machte ich mein Staatsexamen in München. Anschließend arbeitete ich in der Chirurgischen Universitätsklinik als Medizinalassistent.

